

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE
PERIODO 01/04/2013

Perfeccionamiento

1. **APELLIDO:** Gutierrez

NOMBRES: Alejandra Concepción

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): gutialeja@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Estudio y evaluación de la diversidad de parásitos y patógenos, con énfasis en hongos, como potenciales agentes de control microbiano de especies de cucarachas (Insecta. Blattodea) urbanas en la Provincia de Buenos Aires.

Plan de actividades:

Monitoreo de infecciones: La prospección de parásitos y patógenos se llevará a cabo en ninfas y adultos.

El material se colocará en recipientes plásticos para su traslado. A su arribo al laboratorio, se observarán bajo el microscopio estereoscópico para detectar alteraciones en la movilidad, color, morfología y comportamiento. Los ejemplares serán disecados en una solución buffer (pH 7) y los órganos y tejidos con síntomas de infección serán removidos y examinados entre porta y cubreobjetos bajo microscopio óptico con contraste de fases. La metodología a utilizar dependerá del grupo de parásitos hallado: virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos (ver identificación de parásitos y patógenos). Se registra el tipo de parásito, tejido afectado, estado de la larva y prevalencia. El resto de los ejemplares recolectados se colocará en un homogeneizador y se triturará. El material homogenizado se filtra a través de varias capas de muselina y los restos de tejidos se descartan. El filtrado se centrifuga a 800 g durante 5 min. Se examina el sobrenadante y el sedimento al microscopio para determinar la presencia de patógenos. Siguiendo los postulados de Koch se intentará reproducir la patología y demostrar la transmisión del patógeno.

Las cucarachas recolectadas se mantendrán en el insectario del Cepave a 25 °C y 80% HR durante 7 días. Los ejemplares muertos serán identificados taxonómicamente a nivel específico y colocados a 25 °C en cámara húmeda (cápsula de Petri esterilizada conteniendo papel de filtro el que se humedece con agua destilada estéril) para determinar la existencia de infecciones fúngicas. En los adultos muertos, luego de disecados también se determinará la existencia de infecciones por virus, protozoos y nemátodos bajo el microscopio óptico.

Identificación de parásitos y patógenos

Los parásitos y patógenos comunes en insectos son: virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos. La metodología a utilizar para el aislamiento, identificación y estudio varía con cada patógeno y dentro de ellos, según la familia, género y especie hallada. Las técnicas básicas estándares que se seguirán en este estudio para cada parásito.

Cronograma de Trabajo
Referencias de las tareas

1. Prospección de parásitos y patógenos en cucarachas urbanas.
2. Aislamiento, Identificación y cultivo de parásitos y patógenos.
3. Instalación y mantenimiento de colonias de cucarachas en el laboratorio.
4. Estudios de la patogenicidad de los aislamientos.
5. Producción a escala de los mejores candidatos.
6. Ensayos en condiciones seminaturales controladas.
7. Análisis de datos.
8. Elaboración de publicaciones

Tareas	Mar	Abr	May	J Jun	J Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4				X	X	X	X	X	X	X	X	X
5						X	X	X	X	X	X	X
6							X	X	X	X	X	X
7									X	X	X	X
8											X	X

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 1/04/2010

2º AÑO: Fecha de iniciación: 1/04/2011

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 1/04/2012

2º AÑO: Fecha de iniciación: 1/04/2013

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVe)

Facultad: Facultad de Ciencias Naturales y Museo- UNLP.

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: Boulevard 120 entre 61 y 62 *Nº:* s/n

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 0221-4233471

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: López Lastra, Claudia Cristina

Dirección Particular: Calle: *Nº:*

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:*

Dirección electrónica: claudia@cepave.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

- Relevamientos: Se realizó un muestreo directo, se colocaron trampas con “cebos” en diferentes zonas de la ciudad de la Plata. Actualmente se continúa con la cría en laboratorio de *Blattella germanica*, *Blatta orientalis*, *Periplaneta fuliginosa*, *Periplaneta americana* y *Blattella dubia*. Durante el muestreo para la prospección de patógenos se detectaron: hongos Laboulbeniales pertenecientes al género *Herpomycetes* sp. sobre *P. fuliginosa*, *P. americana* y *B. germanica*.

- Disecciones de *P. fuliginosa* (n = 50) y *B. dubia* (n=30): Los insectos fueron anestesiadas con CO₂ durante 30 segundos y disecados en capsulas de Petri con solución salina 0.85 %, con la ayuda de un microscopio estereoscópico se removió el tracto digestivo y se observó la presencia de parásitos en el intestino y cavidad del cuerpo. Los nemátodos fueron hallados vivos en el proctodeo intestinal, encontrándose machos, hembras y larvas. Para su estudio se los fijó en solución salina 0.85 % a 60°C durante 2 minutos; posteriormente fueron colocados durante 48 horas en una solución 1:1 de solución salina y TAF (formol, triethanolamina y agua destilada), se completó la fijación en TAF puro para su posterior identificación taxonómica). Resultados: el 86% presentó algún tipo de parásito, el 76% presentó infección por nemátodos telastomátidos y el 31 % presentó parasitismo por gregarinas. Se determinó en *P. fuliginosa* parásitos pertenecientes a la familia *Thelastomatidae*, las especies fueron *Leidynema appendiculatum* y *Hammerschmidtella diesingi*, para poder llegar a la determinación de especie se realizaron medidas morfométricas de machos y hembras; preparados permanentes y la observación de los nemátodos bajo microscopio electrónico de barrido, por último la extracción de ADN y secuenciación del gen 28 S (Chaudhary A. et al., 2011). En el caso de las gregarinas los trofozoítos, gamontes libres y en asociación (sisigia) se midieron al momento de la disección y se fijaron en alcohol formalina ácido acético (AFA) para la realización de preparados permanentes. Para la búsqueda de gametoquistes se separaron cucarachas en recipientes individuales y 24 horas después se revisaron las heces bajo microscopio estereoscópico, los gametoquistes se separaron individualmente en cajas de Petri con papel de filtro humedecido y a 26°C de temperatura hasta la eclosión de los ooquistes. Se tomaron medidas y se describieron las características morfológicas de todos los estados del ciclo de vida del parásito. Resultados: en *P. fuliginosa* se determinó la presencia de *Gregarina blattarum* y en *B. dubia* la presencia del género *Protomagalhaensia* (Clopton E.R. 2009).

- En la Argentina no se conocen registros previos de hongos patógenos en cucarachas, en nuestra búsqueda se detectaron dos infecciones naturales en especies silvestres, la primera infección sobre cucarachas silvestres se detectó en el Parque Nacional Palmar, Entre Ríos y la segunda en Pearson, Magdalena. Se determinó la presencia en ambas especies de cucarachas de un hongo entomopatógeno determinado como *Metarhizium* sp. Se continúa con la determinación taxonómica de las cucarachas silvestres y la determinación molecular a nivel de especie del hongo. Este sería el primer registro mundial de campo de *Metarhizium* sp sobre cucarachas.

- Se realizaron pruebas preliminares evaluando diferentes aislamientos nativos de hongos para seleccionar cepas patógenas contra cucarachas. Se seleccionaron varias especies fúngicas de la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecani*, *Nomurea rileyi*, *Metarhizium anisopliae*. Se ha determinado que *M. anisopliae* fue el mejor candidato respecto de la virulencia contra *B. germanica* y *P. americana*. Las pruebas preliminares contra *B. germanica* detectaron la susceptibilidad a este aislamiento con elevadas tasas de

mortalidad de los insectos expuestos llegando a mortalidades de 90% en adultos, con dosis 6x10⁶ conidios/cucaracha en 17 días.

- Se realizó aplicación tópica del hongo *M. anisopliae* se evaluó sobre ninfas y adultos de *B. germanica*, *B. orientalis*, *P. americana*, *B. dubia* y *P. fuliginosa*, se aplicaron cuatro dosis (6 x 10³, 6 x 10⁴, 6 x 10⁵, 6 x 10⁶ conidios /cucaracha), Los resultados mostraron que existe una susceptibilidad diferencial en las especies de cucarachas utilizadas y en los diferentes estadios de desarrollo, posiblemente determinada por diferencias en la composición de la cutícula. Los análisis estadísticos demostraron que las diferencias fueron altamente significativas.

- Se realizaron análisis a nivel cuticular por cromatografía gaseosa, para detectar los ácidos grasos libres que forman parte de la cutícula de ninfas y adultos *B. germanica*, *P. fuliginosa*, *P.americana*, *B dubia* y *B orientalis*

- Se probaron dos métodos de aplicación, cebo y contacto, sobre ninfas y adultos de *B. germanica* y *P. fuliginosa*.: explicados en el informe anterior. Se confeccionó una publicación que fue enviada y aún no aceptada. Título: "Susceptibility of the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa* and German cockroach, *Blattella germanica* to entomopathogenic fungi". Autores: Gutiérrez Alejandra C.,García Juan José, Alzogaray Raúl A. and López Lastra Claudia .

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

-Susceptibility of different life stages of *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) and *Periplaneta fuliginosa* (Blattodea: Blattidae) to entomopathogenic fungi

Gutierrez Alejandra C.1, 3, García Juan José1, 3, Alzogaray Raúl A. 2,Urrutia M. I.4, and López Lastra Claudia C.1,

1Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP). Calle 2 N° 584, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-UNIDEF/CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional de

San Martín, Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

3Comisión de Investigaciones Científicas Calle 526 entre 10 y 11 CP: 1900 - La Plata - Buenos Aires – Argentina.

4CeSPI Centro Superior para el Procesamiento de la Información- UNLP, Universidad Nacional de La Plata

Abstract.

The susceptibility of nymphs and adults of the German cockroach, *Blattella germanica* Linnaeus (Blattodea: Blattellidae) and the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa* Serville (Blattodea: Blattidae) to Argentinian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (CEP 085) and *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. (CEP 077) was evaluated. Fungi were tested using two different methods: bait and direct contact. Mortality was monitored daily for twenty days to obtain lethal time 50. *M. anisopliae* produced 60 and 93% mortality in nymphs and adults of *B. germanica*, respectively, when conidia were applied by direct contact. The LT50 for adults was 3.8 days, and 8.6 days for nymphs. Direct contact of *B. bassiana* produced 80% mortality on adults of *B. germanica* with a LT50 of 4.9 days, and in nymphs 40 % mortality in 10 days. When *B. germanica* was exposed to bait, the level of mortality was significant in adults. Nymphs of *P. fuliginosa* were treated with bait with *M. anisopliae* and *B. bassiana* and they caused 50% mortality with a LT50 of 22 days, and LT50 of 27 days respectively. Nymphs and adults of *P. fuliginosa* treated with direct contact and adults treated with bait showed that mortality level was not significantly different as compared to the control. Results showed differences in susceptibility between the two different species of cockroaches and between nymphs and adults in the same species. In addition, different responses to the fungal species with the two methods that were used in the bioassays have been demonstrated. This is the first report of susceptibility of *P. fuliginosa* to entomopathogenic fungi.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, bait, direct contact, lethal time, cockroaches.

Enviada al Journal Austral Entomology. Enviado el 12/03/14. Manuscript ID AEN-4501. Estado: Under review.

-Título: Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales)

Gutierrez Alejandra C.1,3, Marek Gołębowski 2, Pennisi Mariana 4, Peterson Graciela 4, García Juan J.*1,3, Manfrino Romina 1 and López Lastra Claudia C.1

1 Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) UNLP-CONICET. Av. 120 s/n entre 61 y 62, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2 Institute for Environmental and Human Health Protection, University of Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk, Poland

3 Comisión de Investigaciones Científicas Calle 526 entre 10 y 11 CP: 1900 - La Plata - Buenos Aires – Argentina.

4 Prevención del Infarto en Argentina PROPIA - UNLP - CIC Bs. As. Ministerio de Salud Bs. As. Cno. Centenario e/505 y 508 – (1897) - Gonet - Bs. As. – Argentina.

Resumen: Differences in FFA chemical composition of insects may be responsible for susceptibility or resistance to fungal infection. Determination of FFAs found in cuticular lipids can effectively contribute to the knowledge concerning to insect defense mechanisms. In this study, we have evaluated the susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* by topical application. Mortality due to *M. anisopliae* was highly significant on adults and nymphs of *B. germanica*. However, mortality was faster in adults than in nymphs. Adults of *B. orientalis* were not susceptible to the fungus and nymphs of *B. dubia* were more susceptible to the fungus than adults. The composition of cuticular free fatty acids in the three species of cockroaches were also studied. The analysis indicated that all of the fatty acids were mostly straight-chain, long-chain, saturated or unsaturated. Cuticular lipids of three species of cockroaches contained 19 FFA ranging from C14:0 to C24:0. The predominant fatty acids found in the three studied species of cockroaches were Oleic, Linoleic, Palmitic and Stearic acid. Only in adults of *B. orientalis*, Myristoleic acid, γ -Linolenic acid, Arachidic acid, DihomoLinoleic acid and Behenic acid were identified. Lignoceric acid was detected only in nymphs of *B. orientalis*. Heneicosylic acid and docosahexaenoic acid (DHA) were identified in adults of *B. dubia*.

Enviada a Journal of Medical Entomology. Enviada el 14/05/2014. Your Manuscript Number (MS #) is: ME-14-087, Version 1. Estado: enviado.

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

-Nota " **Enemigos Naturales de insectos vectores**" realizada por el programa Científicos Argentinos publicada en la televisión pública (canal 7) el 24/08/2013.

Link de nota en youtube <http://www.youtube.com/watch?v=CnaLbk9uUlc>

- Nota " **Argentine lab finds alternative to pesticides** Argentine lab finds alternative to pesticides Argentine" realizada por la cadena Televisiva Al Jazeera, publicado el día 15 de febrero de 2014. Link de la nota <http://www.aljazeera.com/video/americas/2014/02/argentine-lab-finds-alternative-pesticides-2014215184338827748.html>

- Nota "insecticidas amigable con el medio ambiente" - Revista MI Club Tecnológico. Publicada el 5 de febrero de 2014. <http://www.miclubtecnologico.com.ar/>.

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

- XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013. Presentación en modalidad de Poster el trabajo titulado " Infección experimental de ninfas de Periplaneta americana con el hongo Metarhizium anisopliae". Autores: AC Gutierrez, R Hubner Campos, J Rodrigues, WT Rocha, EK Fernandes, JJ García, CC López Lastra, C Luz. Realizado en Centro de Convenciones Palais Rouge, CABA, Argentina. Del 23 al 26 de septiembre de 2013.

- Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires. Presentación en modalidad de Poster el trabajo titulado "Estudio y evaluación de patógenos de cucarachas (Insecta:Blattodea)". Autores: Gutierrez A.C., Tornesello J., García J.J, López Lastra C.C. Realizado en el Teatro Argentino de la Ciudad de La Plata Prov. Buenos Aires. Los días 19 y 20 de septiembre de 2013.

- Tecno INTI 2013: Jornadas Abiertas de Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica. Presentación en modalidad de Poster el trabajo titulado "Fijación De Ciclodextrinas A Textiles Para La Formación De Nanocomplejos Con Agentes Repelentes A Mosquitos". Autores: Miró Specos, M.M., Zanonni, V., Topollán, D.Y., Arata, J.E., Alberti, C., Garcia, J., Gutierrez, A.C, Hermida, L.G. Realizado en San Martín, .

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

Mención especial realizada por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial a Gutierrez A., C., por su trabajo en colaboración titulado "Fijación de ciclodextrinas a textiles para formación de nanocomplejos con agentes repelentes a mosquitos", área

de materiales.TecnoINTI en las 11° Jornadas abiertas de desarrollo, innovación y transferencia tecnológica. Bs. As., Argentina, del 2 al 4 de Julio de 2013.

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Cargo Jefe de Trabajo Práctico ad-Honorem en la asignatura Patología de Insectos de la carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata. Desde el 5 de mayo de 2012 . Resolución D 212/2012. Expediente: 1000-10052/12. Prof. Titular: Dra. Claudia López Lastra C.E.P.A.V.E. calle 2 nro 584.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario